

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
7. Dezember 2000 (07.12.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/72833 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: A61K 31/00 (74) Anwalt: PERREY, Ralf; Müller-Boré & Partner, Grafinger Strasse 2, D-81671 München (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/04738
- (22) Internationales Anmeldedatum:
24. Mai 2000 (24.05.2000)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
199 24 148.1 26. Mai 1999 (26.05.1999) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): UNIVERSITÄT HEIDELBERG [DE/DE]; Grabengasse 1, D-69117 Heidelberg (DE). FRIEDRICH-SCHILLER-UNIVERSITÄT JENA [DE/DE]; Fürstengraben 1, D-07743 Jena (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): DEIGNER, Hans-Peter [DE/DE]; Konrad-Adenauerstrasse 5, D-69514 Laudenbach (DE). MEISNER, Michael [DE/DE]; Landgrafenstieg 8, D-07743 Jena (DE). KINSCHERF, Ralf [DE/DE]; Eichenweg 29, D-69198 Schriesheim (DE). BIBAK, Nilofar [DE/DE]; Wilhelmsfelder Strasse 43, D-69118 Heidelberg (DE).
- Veröffentlicht:
— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

WO 00/72833 A2

(54) Title: SPHINGOMYELINASE INHIBITOR

(54) Bezeichnung: SPHINGOMYELINASEHEMMER

(57) Abstract: The invention relates to pharmaceutical compositions with antiapoptotic and antiseptic effect that can be used as inhibiting substances of sphingomyelinase. The inventive pharmaceutical compositions are particularly useful for the treatment of septicemia, arteriosclerosis, neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease, and retroviral infection such as HIV infections.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft pharmazeutische Zusammensetzungen mit antiapoptotischer und anti-septischer Wirkung, die als Hemmstoffe der Sphingomyelinasen eingesetzt werden können. Die erfindungsgemässen pharmazeutischen Zusammensetzungen sind insbesondere zur Behandlung von Sepsis, Arteriosklerose, neurodegenerativen Erkrankungen, wie z.B. Morbus Alzheimer, und retroviralen Infektionen, wie z.B. HIV-Infektionen, verwendbar.

"Sphingomyelinasehemmer"

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft pharmazeutische Zusammensetzungen mit antiapoptotischer und antiseptischer Wirkung, die als Hemmstoffe der Sphingomyelinasen wirken. Die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzungen sind insbesondere zur Behandlung von Sepsis, Arteriosklerose, neurodegenerativen Erkrankungen, wie z.B. Morbus Alzheimer, und retroviralen Infektionen, wie z.B. HIV-Infektionen, verwendbar.

Apoptose ist der programmierte Zelltod. Dieser wird z.B. vom Immunsystem genutzt, schädliche Stoffe, wie Viren abzuwehren. Hierzu greifen Virus-spezifische T-Lymphozyten jene Zellen des Körpers an, die Virus-infiziert sind und töten diese ab, indem sie Apoptose-induzierte Proteine freisetzen. Andere Studien ergaben, daß Apoptose auch für die Ausbildung verschiedener Erkrankungen mitverantwortlich ist. Solche Erkrankungen sind z.B. AIDS, Autoimmunerkrankungen und neurodegenerative Erkrankungen.

Der Lipidmediator Ceramid hat einen wesentlichen Anteil bei der Signaltransduktion von oxidativem Stress, der zum Zelltod führen kann. Der Ceramid-medierte Zelltod spielt insofern eine zentrale Rolle bei unterschiedlichsten Erkrankungen wie Sepsis, Arteriosklerose, neurodegenerativen Erkrankungen, wie z.B. Morbus Alzheimer, und retroviralen Infektionen, wie z.B. HIV-Infektionen. Ceramid wird durch die Hydrolyse von Sphingomyelin erzeugt. Der Sphingomyelin-Ceramid-Stoffwechselweg stellt einen Weg dar, Signale von den Rezeptoren auf der Zelloberfläche in den Zellkern unter Verwendung des diffundierenden, lipiden Ceramids als Botenstoff zu übertragen. Die Signalübertragung in die Zellen wird induziert, indem Sphingomyelin durch entsprechende Sphingomyelin-spezifische Phospholipasen, den Sphingomyelinasen, hydrolysiert wird.

Ein Ansatz, die intrazelluläre Zunahme der Konzentration an Ceramid zu vermindern, besteht somit in der Hemmung der Sphingomyelinasen. Es gibt jedoch bislang keine klinischen Studien hinsichtlich irgendwelcher Sphingomyelinase-Hemmstoffe.

5

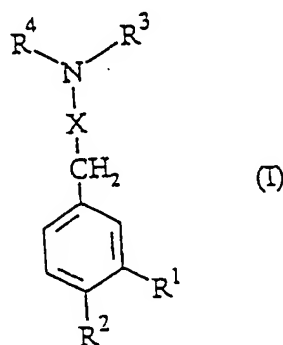
Somit liegt der vorliegenden Erfindung die Aufgabe zugrunde, pharmazeutische Zusammensetzungen bereitzustellen, die als Hemmstoffe der Sphingomyelinasen die intrazelluläre Zunahme der Konzentration an Ceramid vermindern sollen, um so die Verwendung solcher pharmazeutischen Zusammensetzungen zur Behandlung von Sepsis, Arteriosklerose, neurodegenerativen Erkrankungen, wie z.B. Morbus Alzheimer, und retroviralen Infektionen, wie z.B. HIV-Infektionen, vorzusehen. Die pharmazeutische Zusammensetzungen sollen hohe Wirkungselektivität, gleichzeitig aber möglichst geringe Nebenwirkungen bzw. Allgemeintoxizität zeigen.

15

Diese Aufgabe wird durch die in den Ansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen gelöst.

20

Insbesondere werden in einer Ausführungsform pharmazeutische Zusammensetzungen zur Hemmung von Sphingomyelinasen bereitgestellt, enthaltend mindestens eine Verbindung mit der allgemeinen Formel (I)

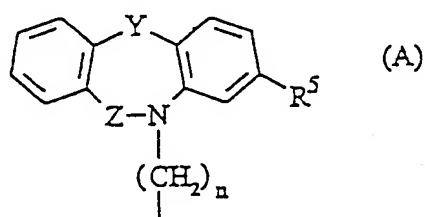


25

30

worin die Reste R^1 und R^2 jeweils unabhängig voneinander ein Wasserstoffatom oder eine Alkoxygruppe mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen bedeuten, X eine Alkylengruppe mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen, die mit einem oder mehreren

Fluoratomen substituiert sein kann, oder eine Ketogruppe -CO- bedeutet, die Reste R^3 und R^4 jeweils gleichzeitig für Phenylreste stehen, die unabhängig voneinander mit einem oder mehreren gerad- oder verzweigt-kettigen Alkyl- oder Alkoxyresten mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen substituiert sein können, oder der Rest R^3 ein Wasserstoffatom oder einen gerad- oder verzweigt-kettigen Alkylrest mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen und der Rest R^4 einen 1-Naphthylalkylenrest $-(CH_2)_n-C_8H_7$, einen [3-(10,11-Dihydro-dibenzo[a,d]cyclohepten-5-yliden)-propyl]-rest- $CH_2CH_2CHC_{15}H_{12}$, einen N-(1-naphthyl)-N-alkylenaminrest- $(CH_2)_n-NH-C_8H_7$, einen N-(5H-Dibenzo[a,d]cycloheptan-5-yl)-N-alkylenaminrest- $(CH_2)_n-NH-C_{15}H_{13}$, oder einen nachstehenden Rest A bedeuten,



wobei n 1, 2 oder 3 ist, R^5 ein Wasserstoffatom oder ein Halogenatom bedeutet, Z eine Alkylenbrücke $-(CH_2)_l-$, wobei l 0 oder 1 ist, bedeutet, Y eine Alkylenbrücke $-(CH_2)_m-$, wobei m 0, 1 oder 2 ist, ein Sauerstoffatom, ein Schwefelatom oder eine NR^6 -Gruppe bedeutet, wobei der Rest R^6 ein Wasserstoffatom, einen gerad- oder verzweigt-kettigen Alkylrest mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen oder einen unsubstituierten oder substituierten Arylrest bedeutet, oder R^3 und R^4 miteinander unter Einbindung des Stickstoffatoms der Formel (I) einen nachstehenden Piperazinring oder Hexahydropyrimidinring bilden



worin der Rest A wie vorgenannt definiert ist und R^7 und R^8 jeweils unabhängig voneinander ein Wasserstoffatom oder eine Alkylgruppe mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen bedeuten, oder ein pharmazeutisch verträgliches Salz davon und gegebenenfalls einen pharmazeutisch verträglichen Träger und/oder ein

pharmazeutisch verträgliches Verdünnungsmittel.

Die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzungen, die mindestens eine Verbindung mit der allgemeinen Formel (I) enthalten, hemmen
5 überraschenderweise in verschiedenen Zelltypen, wie beispielsweise mononukleären Zellen, Fibroblasten und Hepatozyten, die Zunahme der intrazellulären Ceramidkonzentration, die durch Substanzen wie z.B. Tumor-Nekrose-Faktor α , Lipopolysacchariden und oxidierten Lipoproteinen sowie oxidativem Stress, induziert werden kann.

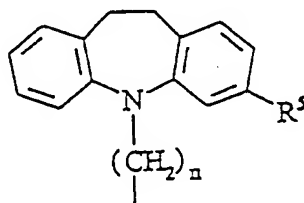
10

Die in den erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzungen enthaltenen Verbindungen mit der allgemeinen Formel (I) wirken dabei nachweislich anti-apoptotisch. Zudem zeigten Versuche, daß sie die Mortalität von Mäusen bei induzierter Sepsis reduzieren. Demgemäß stellen die
15 erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzungen, die mindestens eine Verbindung mit der allgemeinen Formel (I) enthalten, einen neuen Therapieansatz zur Behandlung von beispielsweise Sepsis, Arteriosklerose, neurodegenerativen Erkrankungen, wie z.B. Morbus Alzheimer, und retroviralen Infektionen, wie z.B. HIV-Infektionen, dar.

20

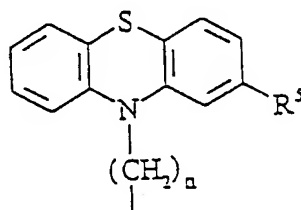
In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist der Rest A ein (10,11-Dihydro-dibenzo[b,f]azepin-5-yl)-N-alkylenrest

25



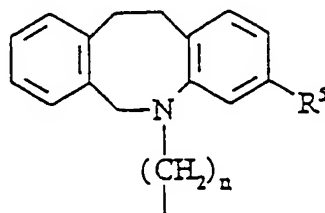
ein Phenothiazin-10-yl-N-alkylenrest

30



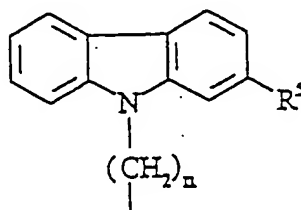
5

ein (5,6,11,12-Tetrahydrodibenzo[b,f]azocin-5-yl)-N-alkylenrest



5

oder ein Carbazol-9-yl-N-alkylenrest



10

Der Rest R^3 in der Formel (I) ist vorzugsweise eine Methylgruppe. Die Reste R^1 und R^2 in der Formel (I) sind vorzugsweise jeweils unabhängig voneinander ein Wasserstoffatom oder eine Methoxygruppe. Der Rest R^5 kann beispielsweise ein Chloratom sein.

15

In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung liegt in der pharmazeutischen Zusammensetzung die Verbindung mit der allgemeinen Formel (I) vorzugsweise in einer Konzentration von 4 bis 80 Gew.-%, mehr bevorzugt 10 bis 60 Gew.-%, am meisten bevorzugt 15 bis 50 Gew.-%, bezogen auf die Gesamtmenge der pharmazeutischen Zusammensetzung, vor.

20

Die Konfektionierung der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzungen unterliegt keiner besonderen Beschränkung, und sie kann in flüssiger, gelartiger oder fester Darreichungsform vorliegen. Die pharmazeutischen Zusammensetzungen können beispielsweise auch in mikroverkapselter Form vorliegen. Die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zubereitungen können neben einer oder mehreren der vorgenannten Verbindungen mit der Formel (I) gegebenenfalls einen für den Durchschnittsfachmann bekannten, herkömmlichen pharmazeutisch verträglichen Träger und/oder ein pharmazeutisch verträgliches Verdünnungsmittel enthalten. Die Verabreichung der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzungen unterliegt keiner besonderen Beschränkung

25

30

und kann beispielsweise oral, intravenös, subkutan, intramuskulär, rektal, topisch und/oder äußerlich einem Patienten appliziert werden.

5 Besonders bevorzugte Verbindungen mit der allgemeinen Formel (I), die in den erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzungen enthalten sein können, sind:

- [3-(10,11-Dihydro-dibenzo[b,f]azepin-5-yl)-N-propyl]-[2-(3,4-dimethoxyphenyl)-ethyl]methylamin (V1),
- 10 [3-(10,11-Dihydro-dibenzo[b,f]azepin-5-yl)-N-propyl]-[2-(4-methoxyphenyl)-ethyl]methylamin (V2),
- [2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-ethyl]-[3-(2-chlorphenothiazin-10-yl)-N-propyl]-methylamin (V3),
- [2-(4-Methoxyphenyl)-ethyl]-[3-(2-chlorphenothiazin-10-yl)-N-propyl]-methylamin (V4),
- 15 [3-(Carbazol-9-yl)-N-propyl]-[2-(3,4-dimethoxyphenyl)-ethyl]methylamin (V5),
- [3-(Carbazol-9-yl)-N-propyl]-[2-(4-methoxyphenyl)-ethyl]methylamin (V6),
- [2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-ethyl]-[2-(phenothiazin-10-yl)-N-ethyl]-methylamin (V7),
- [2-(4-Methoxyphenyl)-ethyl]-[2-(phenothiazin-10-yl)-N-ethyl]-methylamin (V8),
- 20 [(3,4-Dimethoxyphenyl)-acetyl]-[3-(2-chlorphenothiazin-10-yl)-N-propyl]-methylamin (V9),
- N-(1-naphthyl)-N'-[2-(3,4-dimethoxyphenyl)-ethyl]-ethylendiamin (V10),
- N-(1-naphthyl)-N'-[2-(4-methoxyphenyl)-ethyl]-ethylendiamin (V11),
- N-[2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-ethyl]-N-[1-naphthylmethyl]amin (V12),
- 25 N-[2-(4-Methoxyphenyl)-ethyl]-N-[1-naphthylmethyl]amin (V13),
- [3-(10,11-Dihydro-dibenzo[b,f]azepin-5-yl)-N-propyl]-[(4-methoxyphenyl)-acetyl]methylamin (V14),
- [2-(10,11-Dihydro-dibenzo[b,f]azepin-5-yl)-N-ethyl]-[2-(3,4-dimethoxyphenyl)-ethyl]methylamin (V15),
- 30 [2-(10,11-Dihydro-dibenzo[b,f]azepin-5-yl)-N-ethyl]-[2-(4-methoxyphenyl)-ethyl]methylamin (V16),
- [2-(10,11-Dihydro-dibenzo[b,f]azepin-5-yl)-N-ethyl]-[(4-methoxyphenyl)-acetyl]methylamin (V17),

N-[2-(Carbazol-9-yl)-N-ethyl]-N'-[2-(4-methoxyphenyl)-ethyl]piperazin (V18),
1-[3-(Carbazol-9-yl)-N-propyl]-4-[2-(4-methoxyphenyl)-ethyl]-3,5-dimethyl-
piperazin (V19);

[2-(4-Methoxyphenyl)-ethyl]-[3-(phenoxazin-10-yl)-N-propyl]-methylamin(V20),

5 [3-(5,6,11,12-Tetrahydrodibenzo[b,f]azocin)-N-propyl]-[3-(4-methoxyphenyl)-
propyl]methylamin (V21),

N-(5H-Dibenzo[a,d]cycloheptan-5-yl)-N'-[2-(4-methoxyphenyl)-ethyl]-
propylendiamin (V22),

[2-(Carbazol-9-yl)-N-ethyl]-[2-(4-methoxyphenyl)-ethyl]methylamin (V23),

10 [3-(Carbazol-9-yl)-N-propyl]-(4-methoxybenzyl)-methylamin (V30)

[3-(10,11-Dihydro-dibenzo[a,d]cyclohepten-5-yliden)-propyl]-[2-(4-methoxy-
phenyl)-ethyl]methylamin (V31),

(4-Carbazol-9-yl-1,1,2,2,3,3,4,4-octafluorbutyl)-[2-(4-methoxyphenyl)-ethyl]-
methylamin (32),

15 N-[2-(4-Methoxyphenyl)-ethyl]-N-methyl-N',N'-diphenylpropan-1,3-diamin
(V34),

N-[2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-ethyl]-N-methyl-N',N'-diphenylpropan-1,3-diamin
(V35),

20 10-(3-{4-[2-(4-Methoxyphenyl)-ethyl]-3,5-dimethylpiperazin-1-yl}-propyl)-10H-
phenoxazin (V36),

[2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-ethyl]-methyl-(phenoxazin-10-yl-propyl)amin (V37),

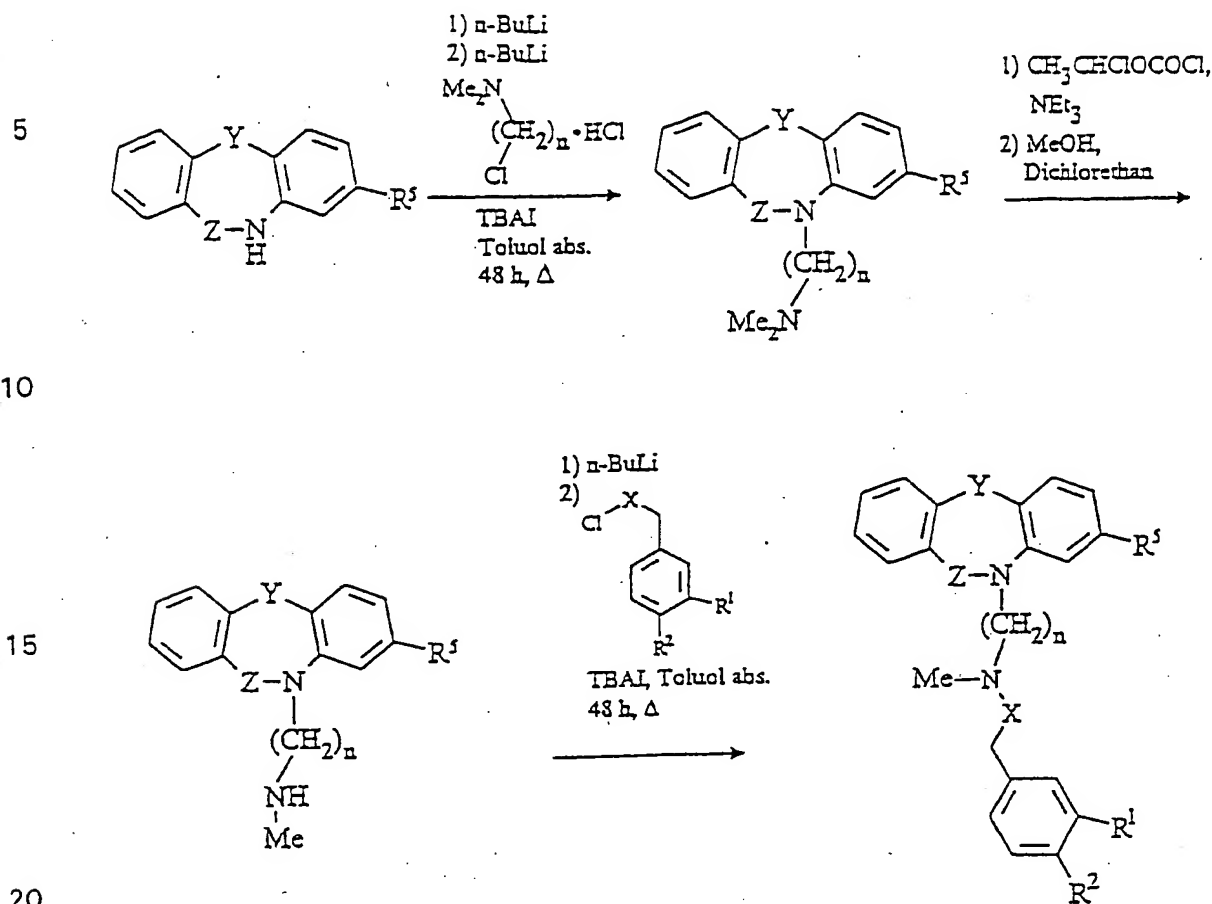
[3-(10,11-Dihydro-dibenzo[a,d]cyclohepten-5-yliden)-propyl]-[2-(3,4-dimethoxy-
phenyl)-ethyl]methylamin (V38),

25 N-(10,11-Dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5-yl)-N'-[2-(3,4-dimethoxyphenyl)-
ethyl]-hexahydropyrimidin (V41) und

10-(3-{4-[2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-ethyl]-3,5-dimethylpiperazin-1-yl}-propyl)-9H-
carbazol (V42).

30 Insbesondere für den Fall, daß der Rest A ein (10,11-Dihydro-dibenzo[b,f]azepin-
5-yl)-N-alkylenrest, ein Phenothiazin-10-yl-N-alkylenrest, ein (5,6,11,12-
Tetrahydrodibenzo[b,f]azocin-5-yl)-N-alkylenrest oder ein Carbazol-9-yl-N-alkylenrest ist, lassen sich die in der erfindungsgemäßen pharmazeutischen
Zusammensetzung enthaltenen Verbindungen mit der Formel (I) beispielsweise

nach dem folgenden Umsetzungsschema, ohne darauf beschränkt zu sein, bereitstellen, wobei n , X , Y , Z , R^1 , R^2 und R^5 wie vorgenannt definiert sind.



TBAI = Tetrabutylammoniumiodid
 n-BuLi = n-Butyllithium

Die vorliegende Erfindung wird nachstehend durch Beispiele detaillierter erläutert:

25 LDL-Herstellung

LDL wurde von gesunden, freiwilligen Testpersonen durch sequentielle Flotation in einer Ultrazentrifuge bei vorbestimmten Dichten erhalten, wie in Havel et al. (J. Clin. Invest. 34, 3145 (1955)) bzw. Deigner et al. (Arzneim.-Forsch./Drug Res. 44, 956, (1994)) beschrieben. Für den Apoptose-Test wurde LDL durch Dialyse gegen Tris-HCl-Puffer, der 20 μ Mol $FeCl_3$ enthielt, für 48 Stunden minimal modifiziert (mmLDL), wie von Watson et al. (J. Clin. Invest. 95, 774 (1995)) beschrieben.

30

Zellkultur und Apoptose-Test

Menschliche, mononucleäre, periphere Blutzellen aus venösem Blut wurden isoliert, gezüchtet und, wie in Kinscherf et al. (The FASEB J. 11, 1317 (1997);
5 The FASEB J. 12, 461 (1998)) beschrieben, bis zum Differenzieren zu MΦ belassen. Differenzierte MΦ wurden mit Lipoproteinmangelserum ($P > 1,21$, durch Ultrazentrifugieren von fötalem Kälberserum hergestellt, wie in Havel et al. beschrieben) für 24 Stunden vor der Testdurchführung gezüchtet, mit der entsprechenden Verbindung für 30 Minuten bei den angeführten Konzentrationen
10 vorbehandelt und anschließend mLDL oder rekombinantem TNF α (3 ng/ml) in dem gleichen Medium ausgesetzt. Die Bestimmung der Apoptose wurde durch Zählen von YOPRO-1-gefärbten apoptotischen Zellen, wie in Idziorek et al. (J. Immunol. Methods 185, 249 (1995)) beschrieben, nach vier Stunden durchgeführt.

SMase-Inhibierung

Menschliche Makrophagen wurden mit entsprechenden, in den erfindungsgemäßen Zusammensetzungen enthaltenen Verbindungen für 30 Minuten und
20 anschließend zwei Stunden mit oxidiertem LDL (27 $\mu\text{g/ml}$) vorbehandelt. Anschließend wurde das Medium entfärbt, die Zellen mit vorgekühltem (4°C) PBS gewaschen und 15 Minuten mit Lysepuffer (NaAc, 250 mMol, pH 5,0, TritonX-100 0,2%) bei 4°C behandelt und zentrifugiert (18.000 g). Die Überstände (5 μl) wurden mit ARB-Puffer (NaAc, 250 mMol, pH 5,0) unter
25 Erhalten einer Proteinkonzentration von 80 $\mu\text{g/ml}$ verdünnt, 45 Minuten mit BODIPY®-FL- C_5 -sphingomyelin (8 nM) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 150 μl Methanol (interner Standard: C_5 -BODIPY®-Säure) zugegeben. Die Proben wurden einer HPLC-Analyse (50% MeOH/10% Tris-HCl, pH 7,5, 10 mMol, 2 ml/min, E. Merck Lichrospher 125-4, 100-5 μMol RP-18, Fluoreszenzdetektion
30 503_{Ex}/512_{Em}) unterworfen.

Die Ceramidkonzentrationen in den Zellen wurden nach Diacylglycerol-katalysierter Phosphorylierung, wie in Kinscherf et al. (FEBS, 405, 55 (1997))

und Dressler et al. (J. Biol. Chem. 265, 14917 (1990)) beschrieben, bestimmt.

Die nachstehende Tabelle zeigt die Apoptose-inhibierende Wirkung hinsichtlich der erforderlichen Konzentration zur Hemmung der Apoptose um 50% (IC-50) sowie die Hemmung der Sphingomyelinaseaktivität in den Zellen als erforderliche Konzentration zur Hemmung um 50% (IC-50) von einigen beispielhaft ausgewählten Verbindungen mit der vorgenannten allgemeinen Formel (I), die in den erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzungen enthalten sein können:

Verbindung	Apoptose (IC-50, μ M)	Hemmung der sauren Sphingomyelinase (Zellen) (IC-50, μ M)
V2	3	15
V3	2	6
V4	5	101
V5	6	8
V6	0,5	9
V8	3	9
V15	1	14
V16	7	16
V18	0,5	33
V19	2,5	9
V20	5	6
V21	11	17
V22	3	10
V23	4	8
V30	1,5	30
V31	1,5	20
V32	18	

V34	3	
V35	6	63
V36	1	
V37	2,5	
V38	6	
V41	7	
V42	4	

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde festgestellt, daß auch 3-(4-Methoxybenzyl)-1H-chinazolin-2,4-dion (Apoptose (IC-50, μM) = 3), 1,3-Bis-(4-methoxybenzyl)-1H-chinazolin-2,4-dion (Apoptose (IC-50, μM) = 0,5) und 9-(4-Methoxybenzyl)-9H-carbazol (Apoptose (IC-50, μM) = 1) als Hemmstoffe der Sphingomyelinasen wirken.

Figur 1 zeigt in einem Diagramm die Phospho-Ceramid-Konzentration (cpm/spot) nach ox. LDL-Stimulierung zum einen ohne (ox) und zum anderen unter Zugabe entsprechender Verbindungen mit der allgemeinen Formel (I), die in den erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzungen enthalten sein können, nämlich [2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-ethyl]-[3-(2-chlorphenothiazin-10-yl)-N-propyl]-methylamin (V3) und [3-(Carbazol-9-yl)-N-propyl]-[2-(4-methoxyphenyl)-ethyl]methylamin (V6). Ferner ist auch die Phospho-Ceramid-Konzentration in Folge der Stimulation durch TNF angegeben.

Figur 2 zeigt in einem Diagramm die Überlebenszeit weiblicher NMRI-Mäuse ($n=48$) nach Injektion von Lipopolysaccharid (LPS, 0,9-1,2 mg, *i.p.*), wobei die Hälfte der Tiere ($n=14$) 10 Minuten mit einer erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung, die 20 mg/kg [3-(Carbazol-9-yl)-N-propyl]-[2-(4-methoxyphenyl)-ethyl]methylamin (V6) enthielt, vorbehandelt (*i.p.*) wurden.

Figur 3 zeigt den prozentualen Anteil apoptotischer Zellen, nachdem die Lebern einiger Versuchstiere - ein Teil war unvorbehandelt, ein anderer Teil war mit der

vorgenannten erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung, die 20 mg/kg [3-(Carbazol-9-yl)-N-propyl]-[2-(4-methoxyphenyl)-ethyl]methylamin (V6) enthielt (jeweils $n=6$), vorbehandelt - entnommen wurden, in Isopentan (N_2 -gekühlt) schockgefroren und auf einem Kryostaten geschnitten wurden. Anschließend wurden apoptotische Zellen mit der TUNEL-Methode identifiziert. Der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen wurde mittels Computer-unterstützter Morphometrie quantifiziert.

Figur 4 zeigt in einem Diagramm die Überlebensrate weiblicher NMRI-Mäuse (Alter 15 Wochen) nach Injektion von Lipopolysaccharid, wobei nahezu die Hälfte der Tiere ($n=8$) (Kontrolle $n=7$) mit einer erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung, die 1-[3-(Carbazol-9-yl)-N-propyl]-4-[2-(4-methoxyphenyl)-ethyl]-3,5-dimethylpiperazin (V19) enthielt, vorbehandelt wurden (Verabreichung 15 min vor der Verabreichung von LPS: 1 ml der Verbindung V19, gelöst in Thomaesonin *i.p.*, 1 ml Thomaesonin in der Kontrolle; anschließend ($t=0$) 0,9 mg LPS, weitere 1 ml der Verbindung V19 nach 1 h).

Mechanismus von anti-apoptotischen Substanzen: aSmase-Inhibitoren

Fig. 5 zeigt die RT-PCR von aSMase in M Φ . Es zeigt sich eine Expression von aSMase (687 bp) nach Inkubation (4 h) von M Φ mit steigenden mmLDL-Konzentrationen.

Fig. 6 zeigt die Wirkung einer Vorbehandlung von M Φ mit einer Zusammensetzung, die [3-(Carbazol-9-yl)-N-propyl]-[2-(4-methoxyphenyl)-ethyl]methylamin (V6) enthält ($2 \mu M$, 30 min), auf die aSMase-Expression und die Apoptose in M Φ (Prozentanteil von apoptotischen M Φ , bestimmt durch YOPRO-1-Färbung nach Inkubation mit Medium oder C_6 -Ceramid ($10 \mu M$) mit oder ohne Vorbehandlung mit der Verbindung V6; Daten sind als Mittelwert \pm SEM von drei Experimenten angegeben. *, $P \leq 0,05$ vs. Kontrolle oder #, $P \leq 0,05$ vs. mit C_6 -Ceramid behandelten Zellen (120 min)).

Eine PCR-Analyse ergab, daß mmLDL den Anteil von aSmase-mRNA in M Φ

deutlich erhöht (vgl. Fig. 5). Sequenzieren des 687 bp umfassenden Produkts bestätigte die Amplifizierung des entsprechenden aSMase-Fragments. Parallel mit einer Stimulierung der aSMase-Transkription wurde ein signifikanter Apoptose-Anstieg festgestellt (0 μ g/ml mmLDL, $7 \pm 2,1$ % [apoptotische Zellen]; 27 μ g/ml, 20,7 \pm 2,7 %; 54 μ g/ml, 29,3 \pm 3,8 %; 100 μ g/ml, 37 \pm 4 %. Daten sind als Mittelwert \pm SEM von drei Experimenten angegeben).

Es gibt insofern einen deutlichen Beleg dafür, daß die mmLDL-vermittelte Apoptose die Erzeugung von Ceramid einschließt. Daher wurde untersucht, ob Ceramid selbst die Bildung des Ceramid liefernden Enzyms, aSMase, stimuliert. Aus Fig. 5 ist zum ersten Male ersichtlich, daß mmLDL, aber auch Ceramid allein die aSMase-Expression induzieren (vgl. Fig. 6), wie es auch für H₂O₂ (30 μ M, nicht gezeigt) der Fall ist. Es wurde festgestellt, daß beispielsweise die Vorbehandlung von M Φ mit einer Zusammensetzung, welche [3-(Carbazol-9-yl)-N-propyl]-[2-(4-methoxyphenyl)-ethyl]methylamin (V6) enthält, sowohl die Ceramid-vermittelte aSMase-Transkription und die Induktion von Apoptose (vgl. Fig. 6) als auch die Aktivierung des Enzyms verhinderte, wie in Zelllysaten gemessen. Ähnliche Ergebnisse wurden in mit mmLDL behandelten M Φ erhalten (Daten nicht gezeigt). Ferner wurde festgestellt, daß die Vorbehandlung von M Φ mit einer Zusammensetzung, die [3-(Carbazol-9-yl)-N-propyl]-[2-(4-methoxyphenyl)-ethyl]methylamin (V6) enthält, ebenso einen durch mmLDL (27 μ g/ml) initiierten Anstieg der aSMase-Aktivität in Zelllysaten vollständig verhindert (Basis: Aktivität 2,18 nmol/h x mg)).

[3-(Carbazol-9-yl)-N-propyl]-[2-(4-methoxyphenyl)-ethyl]methylamin (V6), eine Verbindung ohne Redoxaktivität, sowie andere erfindungsgemäße Zusammensetzungen, die eine der vorgenannten Verbindungen wie z.B. [2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-ethyl]-[3-(2-chlorphenothiazin-10-yl)-N-propyl]-methylamin (V3) enthalten, inhibieren die mmLDL- oder Ceramid-induzierte Enzyminduktion, die Stimulierung der Ceramidbildung und vermindert parallel dazu den programmierten Zelltod in M Φ . Bei etwas erhöhten Konzentrationen kann eine vollständige Inhibierung der aSMase-Expression erzielt werden. Ohne daran gebunden zu sein, kann somit angenommen werden, daß, wenn direkte In-

hibierungswirkungen hinsichtlich des isolierten Enzyms nicht vorliegen, die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen durch Inhibierung der aSMase-Transkription wirken.

5 Methoden

Menschliche, -mononucleäre, periphere Blutzellen aus venösem Blut wurden mittels Ficoll-Paque (Sigma, Deisenhofen, BR Deutschland) Dichtegradientenzentrifugierung isoliert.

- 10 MΦ wurden mmLDL (27 $\mu\text{g/ml}$), C_6 -Ceramid (10 μM) bzw. H_2O_2 (30 μM) unterworfen. Apoptotische Zellen wurden mittels YOPRO-1-Färbung (s. Idziorek et al, J. Immunol. Methods, 185, 1995, 249-258) und/oder mittels TUNEL-Technik (Quantum Appligene, Heidelberg, BR Deutschland) identifiziert. Die Bestimmung der Apoptose (Prozentanteil apoptotischer Zellen) wurde durch
- 15 Zählen von YOPRO-1-gefärbten apoptotischen Zellen unter Verwendung eines Mikroskops, ausgestattet mit einer Quecksilberlampe und einer Fluoreszenzeinheit in Kombination mit einem Computer-unterstützten Morphometriesystem, quantifiziert.

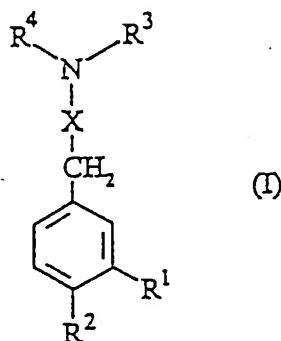
20 RT-PCR

Für die Amplifizierung der aSMase waren die Primer und die Bedingungen wie folgt:

- 5' -CAGGGTTCCTGGCTGGGCAGCA-3' (vorwärts) und
- 25 5' -GGTCCTGGACCATGAGACCTAC-3', 94°C, 60°C, 72°C, jeweils 1 min, 40 Zyklen (Sequenzanalyse des gereinigten PCR-Produkts durch das Deutsche Krebsforschungszentrum, Heidelberg, BR Deutschland, bestätigte die Amplifizierung des erwarteten aSMase-Fragments).

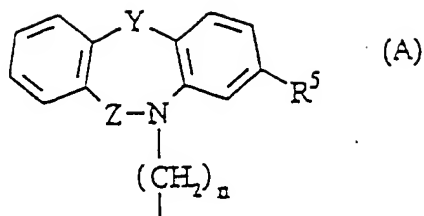
Ansprüche

1. Pharmazeutische Zusammensetzung zur Hemmung von Sphingomyelinasen, enthaltend mindestens eine Verbindung mit der allgemeinen Formel (I)

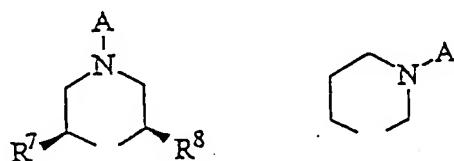


worin die Reste R^1 und R^2 jeweils unabhängig voneinander ein Wasserstoffatom oder eine Alkoxygruppe mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen bedeuten, X eine Alkylengruppe mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen, die mit einem oder mehreren Fluoratomen substituiert sein kann, oder eine Ketogruppe -CO- bedeutet, die Reste R^3 und R^4 jeweils gleichzeitig für Phenylreste stehen, die unabhängig voneinander mit einem oder mehreren gerad- oder verzweigtkettigen Alkyl- oder Alkoxyresten mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen substituiert sein können, oder der Rest R^3 ein Wasserstoffatom oder einen gerad- oder verzweigtkettigen Alkylrest mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen und der Rest R^4 einen 1-Naphthylalkylenrest $-(CH_2)_n-C_8H_7$, einen [3-(10,11-Dihydro-dibenzo[a,d]cyclohepten-5-yliden)-propyl]-rest $-CH_2CH_2CHC_{15}H_{12}$, einen N-(1-naphthyl)-N-alkylenaminrest $-(CH_2)_n-NH-C_8H_7$, einen N-(5H-Dibenzo[a,d]cycloheptan-5-yl)-N-alkylenaminrest $-(CH_2)_n-NH-C_{15}H_{13}$, oder einen nachstehenden Rest A bedeuten,

16



wobei n 1, 2 oder 3 ist, R^5 ein Wasserstoffatom oder ein Halogenatom bedeutet, Z eine Alkylenbrücke $-(CH_2)_l-$, wobei l 0 oder 1 ist, bedeutet, Y eine Alkylenbrücke $-(CH_2)_m-$, wobei m 0, 1 oder 2 ist, ein Sauerstoffatom, ein Schwefelatom oder eine NR^6 -Gruppe bedeutet, wobei der Rest R^6 ein Wasserstoffatom, einen gerad- oder verzweigt-kettigen Alkylrest mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen oder einen unsubstituierten oder substituierten Arylrest bedeutet, oder R^3 und R^4 miteinander unter Einbindung des Stickstoffatoms der Formel (I) einen nachstehenden Piperazinring oder Hexahydropyrimidinring bilden



worin der Rest A wie vorgenannt definiert ist und R^7 und R^8 jeweils unabhängig voneinander ein Wasserstoffatom oder eine Alkylgruppe mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen bedeuten, oder ein pharmazeutisch verträgliches Salz davon und gegebenenfalls einen pharmazeutisch verträglichen Träger und/oder ein pharmazeutisch verträgliches Verdünnungsmittel.

2. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei der Rest A ein (10,11-Dihydro-dibenzo[b,f]azepin-5-yl)-N-alkylenrest, ein (5,6,11,12-Tetrahydrodibenzo[b,f]azocin-5-yl)-N-alkylenrest, ein Phenothiazin-10-yl-N-alkylenrest oder ein Carbazol-9-yl-N-alkylenrest ist.
3. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 1 oder 2, wobei der Rest R^3 eine Methylgruppe ist.

4. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Reste R^1 und R^2 jeweils unabhängig voneinander ein Wasserstoffatom oder eine Methoxygruppe sind.
- 5 5. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei der Rest R^5 ein Chloratom ist.
6. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Verbindung mit der allgemeinen Formel (I) in einer Konzentration
10 von 4 bis 80 Gew.-%, bezogen auf die Gesamtmenge der pharmazeutischen Zusammensetzung, vorliegt.
7. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, welche in flüssiger, gelartiger oder fester Darreichungsform vorliegt.

Fig. 1

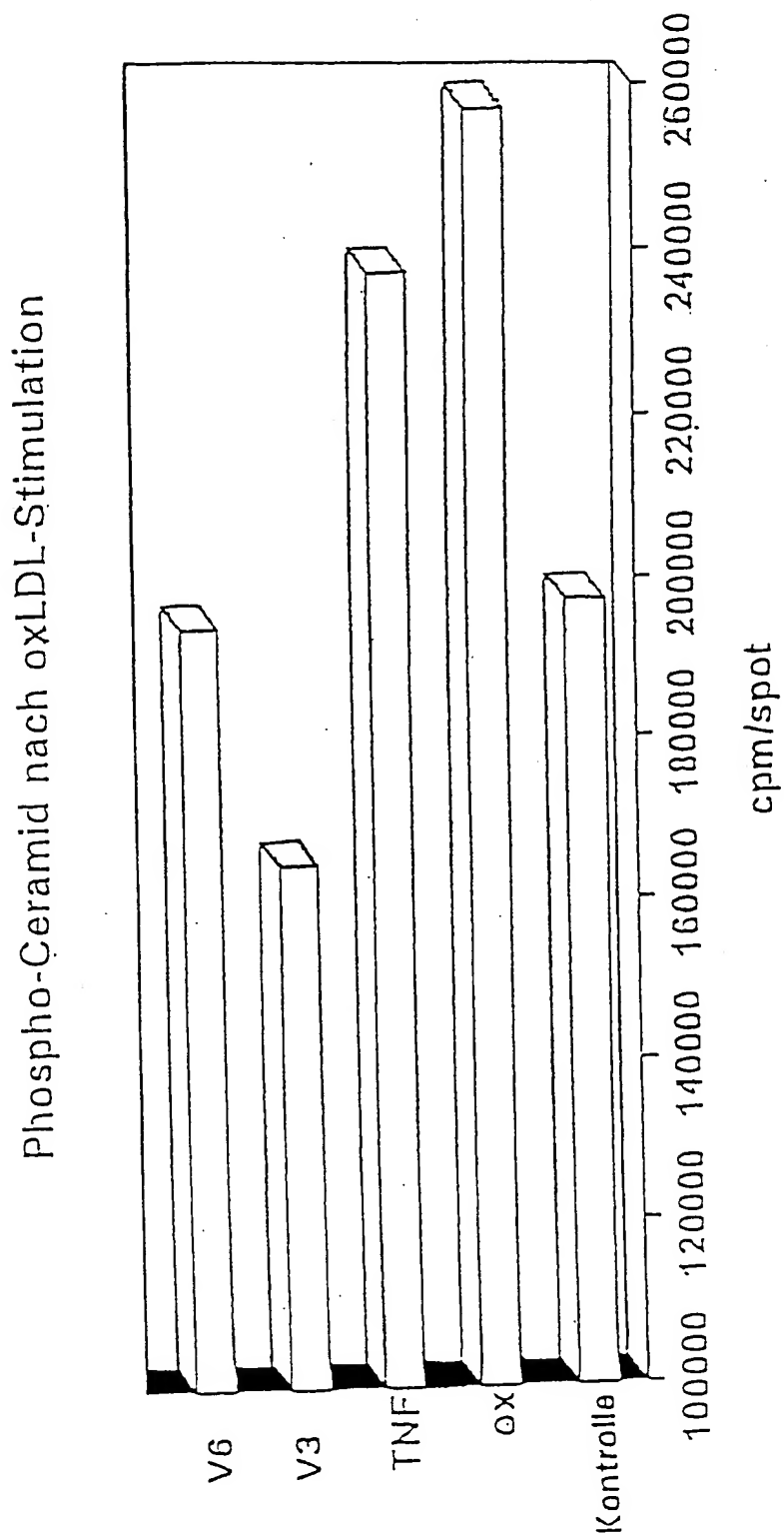
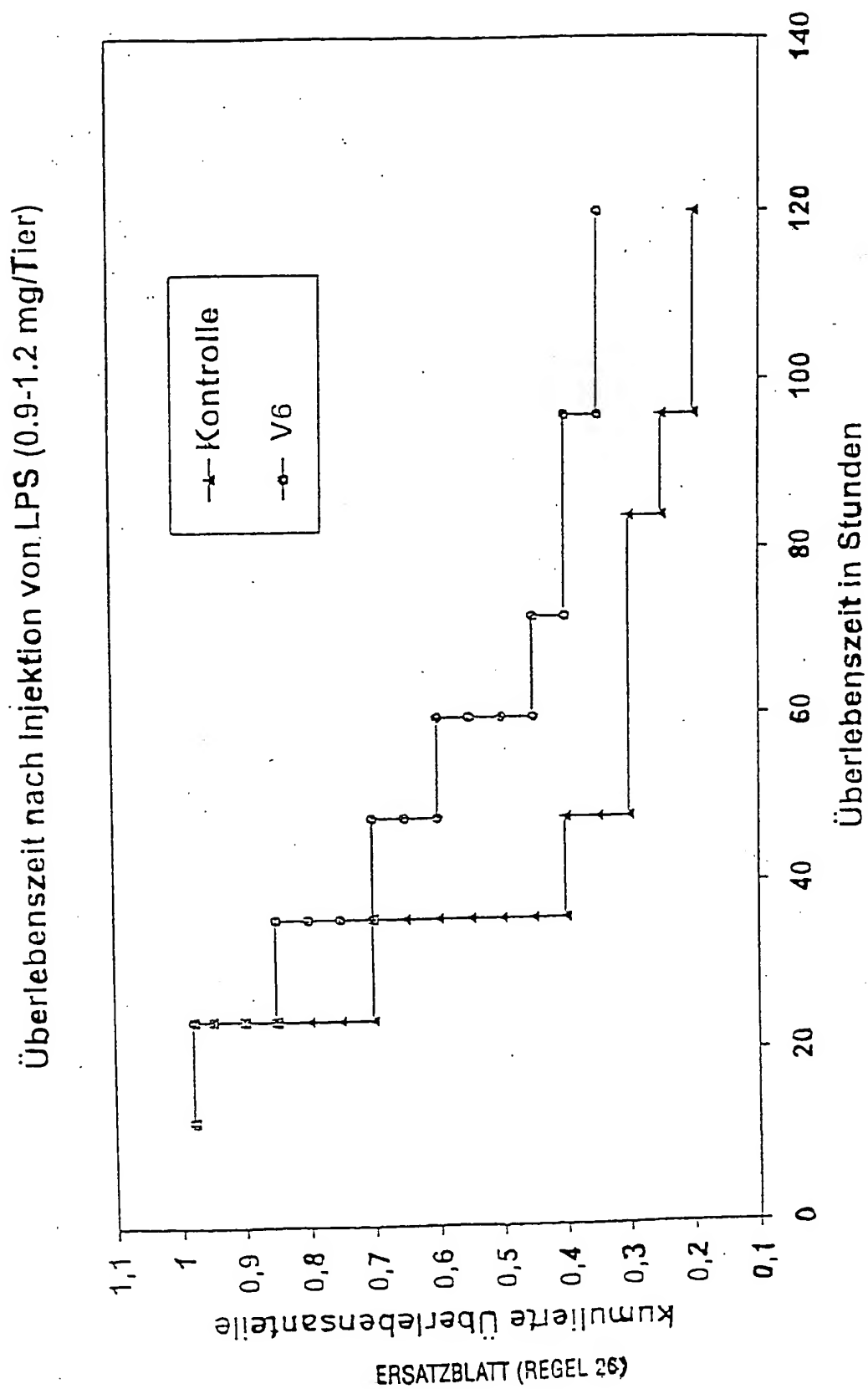


Fig. 2

2/5



3/5

Fig. 3

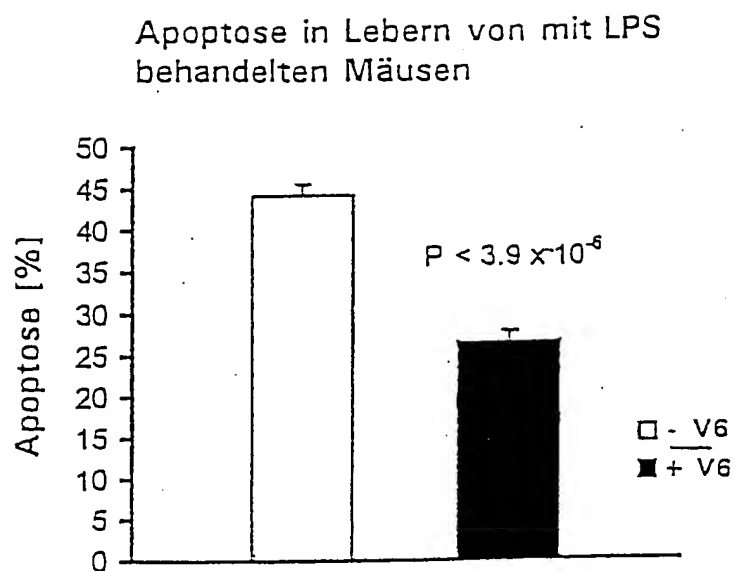


Fig. 4

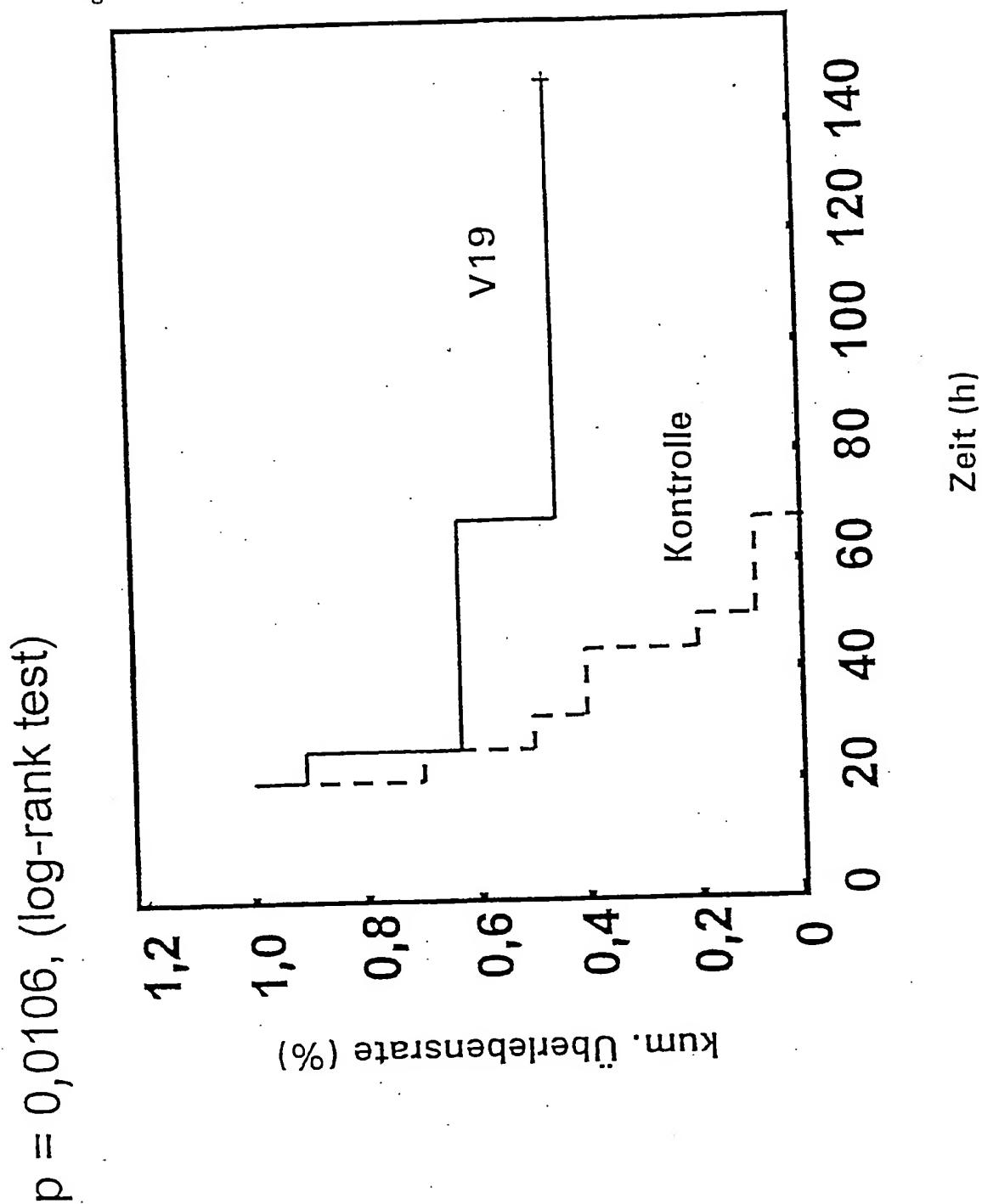


Fig. 5

5/5

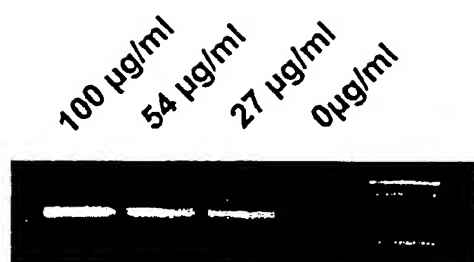
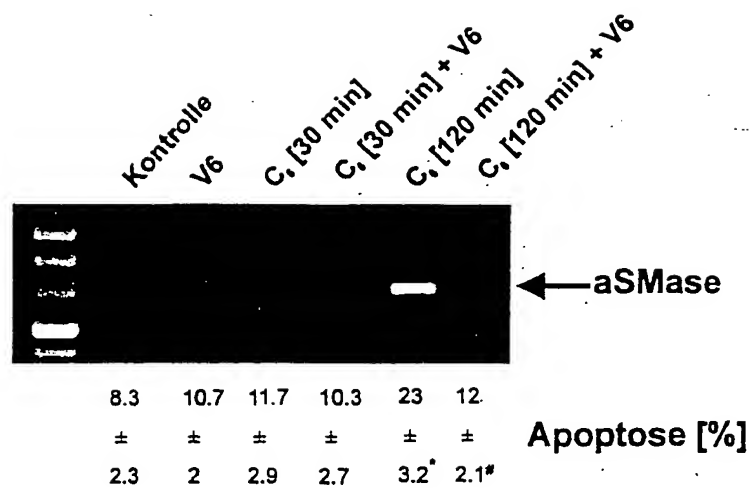


Fig. 6



THIS PAGE BLANK (USPTO)